

2) PCT/EP98/07722

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 14/47, C12P 19/34, 21/02, A61K 38/17</b>		<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/04007</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	6. Februar 1997 (06.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01337 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 1996 (17.07.96) (30) Prioritätsdaten: 195 25 992.0       17. Juli 1995 (17.07.95)       DE 195 30 500.0       18. August 1995 (18.08.95)       DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WISSLER, Josef [DE/DE]; Gartenfeldstrasse 28, D-61231 Bad Nauheim (DE). LO- GEMANN, Enno [DE/DE]; Speckbacher Weg 3, D-79111 Freiburg (DE). KIESEWETTER, Stefan [DE/DE]; An der Pfaffengasse 10, D-96486 Lautertal (DE). HEILMEYER, Ludwig [DE/DE]; Girondelle 93, D-44799 Bochum (DE). (74) Anwalt: BUTENSCHÖN - BERGMANN - NÖTH - REITZLE - GRAMBOW - KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: METAL-CONTAINING RIBONUCLEOTIDE POLYPEPTIDES			
(54) Bezeichnung: METALLHALTIGE RIBONUKLEOTIDPOLYPEPTIDE			
(57) Abstract			
<p>Bioactive copper-, zinc- or calcium-containing ribonucleopolyptides (RNP) are disclosed. They are non-mitogenic morphogenetic agents for blood vessels and have a defined primary structure for intercellular communication containing genetic information. Zn/Ca/Cu-RNP may enzymatically hydrolyse nucleic acids in a controlled manner (controlled nuclease activity) and their bioactivity may be mutually modulated and controlled by means of their Zn/Ca/Cu metal ion content, that acts as a "molecular switch". These compounds selectively stimulate directional growth or morphogenesis of blood vessels <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> and cause neovascularisation of tissues. Also disclosed are a process for preparing and extracting RNP, their use and medicaments.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft bioaktive kupfer-, zink- oder calciumhaltige Ribonukleopolyptide (RNP). Diese sind nichtmitogene Morphogene für Blutgefäße von definierter Primärstruktur zur interzellulären Kommunikation mit genetischer Information. Zn/Ca/Cu-RNP können enzymatisch Nukleinsäuren reguliert hydrolysieren (regulierte Nukleaseaktivität) und über Zn/Ca/Cu-Metallionengehalte als "molekulare Schalter" in ihrer gegenseitigen Bioaktivität moduliert und reguliert werden. Die Verbindungen regen selektiv das Richtungswachstum bzw. die Morphogenese von Blutgefäßen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> an und führen zu einer Neovaskularisierung von Geweben. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung und Gewinnung der RNP sowie ihre Verwendung und Arzneimittel.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**Metallhaltige  
Ribonukleotidpolypeptide**

Die vorliegende Erfindung betrifft metallhaltige Ribonukleotidpolypeptide (RNP) sowie ein Verfahren zu deren Herstellung, deren Verwendung und Arzneimittel, die Ribonukleotidpolypeptide bzw. Antikörper gegen Ribonukleotidpolypeptide und/oder deren molekularbiologische Äquivalenzstrukturen und/oder Teile und/oder Derivate enthalten.

Die Gewebehomeostase des Körpers, seiner Organe und Gewebe ist abhängig von Regulationsmechanismen der Angiogenese (Lateral- und Richtungswachstum der Blutgefäßkapillaren). Sie beeinflusst sowohl die Gewebereparatur und Wundheilung, Gewebeneubildung in der Embryogenese und den Reproduktionszyklen als auch das Anwachsen, die Rückbildung und die Zerstörung von Tumoren, Transplantanten und gefäßversorgten und gefäßfreien Geweben.

Bisher wurden noch keine nichtmitogenen Mediatoren gefunden, mit denen eine Beeinflussung der Gewebhomeostase möglich ist, d.h. Induktion und Regulierung des Gefäßwachstums.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, einen nichtmitogenen Mediator der Gewebhomeostase bereitzustellen, mit dem vorrangig die Gewebereparatur, Wundheilung, Angiogenese und Neovaskularisierung beeinflußt werden kann. Aufgabe der Erfindung ist weiter die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung der nichtmitogenen Mediatoren sowie eines Arzneimittels, das diesen nichtmitogenen Mediator enthält.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein bioaktives Ribonukleotidpolypeptid gemäß Patentanspruch 1, durch ein Verfahren gemäß Patentanspruch 5 bzw. 26, durch ein Arzneimittel gemäß Patentanspruch 28 oder 29 sowie durch die Verwendung gemäß Patentanspruch 30 oder 31.

Von den Erfindern wurde gefunden, daß es nichtmitogene zelluläre Mediatoren auf Nukleinsäurebasis mit definierter Sequenz gibt, die spezifisch die Bildung von Blutgefäßen in vivo und in vitro verursachen können und biologisch spezifische, natürlich wirkende nichtmitogene Mediatoren der Angiogenese bzw. des Richtungswachstums von Blutgefäßsprossen darstellen.

Die von den Erfindern erstmals nachgewiesene neue Klasse zellulärer Morphogene für Endothelzellen liegt in Form bioaktiver Metall-Ribonukleotidpeptide (RNP) vor. Das Metall kann vorzugsweise Calcium, Kupfer oder Zink sein.

Im RNA-Teil enthalten sie unter anderem folgende Sequenz der Nukleotide oder Teile oder Derivate davon:

AAAGAGAAAGCUGCUCCGAAGNCAG

Im Proteinteil enthalten Sie unter anderem die folgende Proteinsequenz:

NH<sub>2</sub>-TKLEDHLEGIINIFHQYSVRLG

HYDTLIKRELKQLITKELPNTLKN

TKDQGTIDKIFQNLDANQDEQVSF

KEFVVLVTDVLITAHDNHKE-COOH

Erfindungsgemäß sollen die Sequenzen so verstanden werden, daß auch RNP darunter fallen, bei denen im RNA-Teil und/oder Proteinteil Austausch von Nukleotiden und/oder Aminosäuren gegenüber den oben gezeigten Sequenzen stattgefunden haben bzw. daß nur Teile der obigen Sequenzen vorhanden sind.

Die Erfindung betrifft auch DNA, kodierend für die oben genannten Aminosäuren, wobei die DNA umfaßt:

- (a) die nachfolgende DNA oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,

Reverse translated 1-91	
T K L E D H L E G I I N I F H Q Y S V R	20
ACCAAGCTGGAGGACCACCTGGAGGGCATCATCAACATCTTCCACCAGTACTCTGTGCGG	
L G H Y D T L I K R E L K Q L I T K E L	40
CTGGGCCACTATGACACCCTGATCAAGCGGGAGCTGAAGCAGCTGATCACCAAGGAGCTG	
F N T L K N T K D Q G T I D K I F Q N L	60
CCCAACACCCTGAAGAACACCAAGGACCAGGSCACCATTGACAAGATCTTCCAGAACCTG	
D A N Q D E Q V S F K E F V V L V T D V	80
GATGCCAACCCAGGATGAGCAGGTGTCCTTCAAGGAGTTTGTGGTGCTGGTGACAGATGTG	
L I T A H D N I H K E	91
CTGATCACAGCCCATGACAACATCCACAAGGAG	

- oder
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA,  
oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Die im RNA-Teil enthaltenen Nukleotide wurde in DNA übersetzt:

RNA / DNA

AAAGAGAAAGCNGCNCAGGAGNCAG

CTGACCTTCGGNGCNGCTTTCTCTTT

Die erfindungsgemäßen RNP sind weiter durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

- a) biologische Wirkungen in vitro und in vivo:
- zellselektive morphogene Wirkung in vitro auf isolierte, primäre und/oder klonierte Blutkapillarendothelzellen in Kultur zur nichtmitogenen Induktion der Änderung des Zellphänotyps aus dem konfluenten Zustand, zur nichtmitogenen Änderung und Erhöhung der Zellwanderungsfähigkeit und zur nichtmitogenen Änderung der spatiotemporalen suprazellulären Organisation der Zellen zu dreidimensionalen organoiden, kapillarähnlichen Strukturen in Kultur;
  - spezifische chemotropische Wirkung auf Blutgefäße in vivo;
  - Induktion eines Richtungswachstums (Chemotropismus) von Blutgefäßen in vivo;

- während des Sprossungsstadiums in vivo haben die Spitzen der wachsenden Kapillaren erhöhte Permeabilität;
- Induktion einer Neovaskularisierung von Geweben durch gerichtetes Einwachsen von Blutgefäßen;
- LD<sub>50</sub> nicht bestimmbar, da keine lethalen Wirkungen;
- keine Mobilisierung adulter oder juveniler Leukozyten (keine Leukozytose- oder Linksverschiebungsreaktionen) in vivo;
- keine direkte Aktivität auf glatte Muskulatur in vitro;
- keine spasmogene Aktivität auf glatte Muskulatur in vitro;
- keine spasmogene Aktivität auf gestreifte Muskulatur in vitro;
- keine endotoxingleichen oder -ähnlichen Wirkungen in vivo und in vitro;
- keine chemische Anlockung (Chemotaxis) von Leukozyten in vitro;
- keine positive oder negative chemokinetische Wirkung auf Leukozyten in vitro;
- keine phagozytosestimulierende Wirkung auf Leukozyten in vitro;
- keine ersichtlichen Schock- oder andere systemisch abträglichen Wirkungen vom Soforttyp oder protrahierten Typ im Gesamtorganismus in vivo;
- keine Lysewirkungen auf Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten in vitro;
- keine signifikante pyrogene Wirkung in vivo;
- keine direkte Kapillarpermeabilitätserhöhung im Hauttest in vivo;
- keine mitogene Wirkung auf Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen in vitro;

- \* Zn/Cu/Ca-RNP können regulierte und selektive Nukleasewirkung entfalten und über Zn/Cu/Ca-Metallionengehalte als "molekulare Schalter" in ihrer gegenseitigen Bioaktivität moduliert und reguliert werden.

b) physikalisch-chemische und chemisch-strukturelle Eigenschaften:

- typische Eigenschaften einer Ribonukleinsäure (RNA) im Komplex des RNP mit Polypeptid (Protein) und Kupfer-, Zink- und Calciumionen,
- typische Proteineigenschaften und Proteinreaktionen des Polypeptidteiles (Folin- und Biuretreaktion) im Komplex des RNP mit RNA und Kupfer-, Zink- und Calciumionen,
- Schmelzpunkt: etwa 200 °C (Zers. unter Luft- und Sauerstoffausschluß);
- bei der Hydrolyse von z.B. CuRNP im 5NHCl, 150 °C, 1 h wird das Kupferion freigesetzt und kann als gelbes, sich schwärzendes Kupfer-I-oxid abgetrennt werden;
- sie können entstehen als zelluläre Mediatoren;
- elektrophoretische Wanderung bei pH 7,40 in Acrylamidmatrizen: anodisch oder als breite Verteilung über die ganze Laufstrecke (anomales hydrodynamisches Verhalten);
- löslich in wäßrigen Medien einschließlich 20 % Äthanol bei einem pH-Wert von mindestens 4,0 bis 10;
- konstanter Temperaturkoeffizient der Löslichkeit in Ammoniumsulfatlösungen zwischen -10 °C und +50 °C;
- sie enthalten unter anderem die Aminosäuren im Polypeptidteil des RNP: Alanin (A), Asparagin-



säure (D), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Isoleucin (I), Lysin (K), Leucin (L), Prolin (P), Arginin (R), Serin (S), Theonin (T), Valin (V), Tyrosin (Y);

- sie sind am 5'-Ende der Nukleotidsequenz im RNA-Teil des RNP durch einen Phosphatrest blockiert;
- sie enthalten mindestens ein Kupferion im RNP-Komplex;
- sie enthalten modifizierte Basen im RNA-Teil des RNP, von denen mindestens eine durch Isoguanosin repräsentiert werden kann;
- Adsorptionsspektrum (UV, sichtbarer und naher IR-Bereich) nukleinsäurentypisch ( $E_{260 \text{ nm}} \geq E_{280 \text{ nm}}$ );
- Molekularmasse des nativen RNP (Primärstruktur): etwa 40'000 Daltons (kleinstes gemeinsames Vielfaches der RNP-Komponenten);
- keine Proteinquartärstruktur im Proteinteil des RNP in Form physikalisch gebundener Peptiduntereinheiten, das native Protein besteht nur aus einer Peptideinheit (kleinstes gemeinsames Vielfaches der RNP-Einheit);
- löslich in einer Ammoniumsulfatlösung bei einer Sättigung von 90 % (3,6 mol/l);
- sie verhalten sich hydrodynamisch anormal, so daß das hydrodynamische Äquivalent der Molekularmasse etwa 20-fach kleiner erscheint als die wirkliche Molekularmasse der Komponenten in Form des kleinsten gemeinsamen Vielfachen der Komponenten, soweit bestimmbar durch gelchromatographische, elektrophoretische und Membranmethoden;
- sie permeieren deshalb durch Membranen mit einer nominalen Rückhaltgrenze von > 1000 Dalton;
- sie adsorbieren reversibel in Struktur und biologischer Aktivität an Anionen- und Kationentau-

schern, Calciumphosphatgel und Hydroxylapatit und können nativ der Volumenverteilungschromatographie unterworfen werden.

Die bioaktiven RNP der Erfindung sind zelluläre Entzündungs- und Wundheilungsmediatoren mit topobiochemisch und biologisch spezifischer Wirkung. Ihre biologische Aufgabe ist die Induzierung und Regulierung des nichtmitogenen Gefäßrichtungswachstums. Dies kann zur Neovaskularisierung von Gewebe führen. Sie entstehen in vitro bei der Kultur von Leukozyten oder in vivo bei der Ansammlung von Leukozyten am Entzündungsort neben einer Vielzahl anderer Hormone und Mediatoren.

Die erfindungsgemäß hergestellten und gewonnenen bioaktiven RNP-Morphogene stellen wertvolle körpereigene Wirkstoffe dar. Sie können beispielsweise zur Beeinflussung des vaskulären Status von Geweben (z.B. Herzmuskelgewebe, Skelettmuskelgewebe, Lunge, Wundheilung, Reproduktionszyklen, Embryogenese und Transplantationen) verwendet werden. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit ist die Herstellung von Hemmstoffen der unerwünschten Angiogenese und Neovaskularisierung von Geweben bei pathologischen Erscheinungen bei der Tuberkulose, Diabetes, Tumoren, Reproduktionszyklen und Gewebetransplantationen. Als parakrin wirkende Mediatoren können sie genetische Informationen von Zelle zu Zelle übertragen ("shutteln"). Sie können damit auch in der Gentechnik zur Übertragung genetischer Information mit einem optimierten Nukleinsäureanteil ("horizontaler Transfer") und mit enzymatischen Wirkungen (Nukleaseaktivität) zur Beeinflussung des Nukleinsäuregehaltes und der zellulären Funktionen (z.B. Differenzierung) angewendet werden.

Die bioaktiven RNP-Morphogene der Erfindung können einzeln oder als Gemisch in Form üblicher Arzneimittel lokal bei Säugern, z.B. Menschen, in einer Menge von  $> 1$  fmol in Konzentration  $> 10$  pmol/l gegeben werden. Die Schwellendosis der Wirksamkeit in vivo beträgt  $> 50$  fmol, vorzugsweise 2,5 fmol. Diese Arzneimittel eignen sich zur spezifischen Beeinflussung der Angiomorphogenese und des vaskulären Zustandes eines Gewebes des Körpers eines Säugers. Diese Arzneimittel können zur Erfüllung der gleichen Aufgaben auch mindestens ein anti-RNP-Immunglobulin und/oder molekularbiologische Äquivalenzstrukturen enthalten.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung und Gewinnung der bioaktiven RNP-Morphogene der Zellen des retikulo-endothelialen Systems, der Leukozyten und des Entzündungsgewebes, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Zellen, z.B. Leukozyten oder Entzündungsgewebe homogenisiert oder Leukozyten kultiviert und die entstandenen RNP-Morphogene aus den Homogenaten oder aus der überstehenden Kulturlösung gewinnt.

Grundsätzlich ist es auch möglich, die Zellen, z.B. Leukozyten, auf Mediatoren direkt ohne Kultur aufzuarbeiten.

Die Kultur der Zellen (Leukozyten) kann grundsätzlich in jedem die Zellen (Leukozyten) erhaltenen Medium durchgeführt werden.

Zur Kultur von Zellen, wie Leukozyten, wird den Kulturmedien bei einer geplanten Dauer der Kultur über 1 Stunde meist Serum, beispielsweise Kalbsserum oder Pferdeserum, zugesetzt, da die Serumbestandteile für

die Erhaltung der Lebensfunktionen der Zellen günstig sind. Wenn jedoch die serumhaltige Kulturlösung auf Proteine (Mediatoren) aufgearbeitet werden soll, die durch die Kultur erzeugt werden, bereitet die Gewinnung der meist nur in geringen Konzentrationen enthaltenen Produktproteine wegen der Vielzahl der aus dem Serum stammenden fremden Proteine große Schwierigkeiten. Außerdem kann dabei nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob ein bestimmter Mediator humoraler oder zellulären Ursprungs ist und von welcher Spezies er stammt; d.h. ob er ein Mediator der Spezies ist, deren Zellen kultiviert wurden, oder der Spezies, von der das verwendete (meist heterologe) Serum stammt.

Das erfindungsgemäß bevorzugt verwendete vollsynthetische Zellkulturmedium enthält die üblichen Stoffgruppen, wie Salze, Zucker, Aminosäuren, Nucleoside und Nucleosidbasen, Vitamine, Vitaminoide, Coenzyme und/oder Steroide in wäßriger Lösung. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich einen oder ein Gemisch von mehreren Stoffen enthält, die sich als besonders wertvoll für die Lebensfähigkeit und das Wachstum der Leukozyten und ihre Fähigkeit zur Mediatorproduktion erweisen. Zu diesen Stoffen gehören ungesättigte Fettsäuren, Flavonoide, Ubichinone, Vitamin C und Mevalolacton.

Das Zellkulturmedium wird zur längerdauernden Zell- oder Leukozytenkultur vorzugsweise ohne Zusatz von Serum verwendet. Statt dessen erhält es mindestens ein definiertes Protein, das in einer besonders bevorzugten Ausführungsform hochreines, molekular einheitliches Serumalbumin ist.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen kann das erfindungsgemäß verwendete, vollsynthetische serumfreie Zellkulturmedium noch weitere, für die Kultur von Leukozyten günstige Verbindungen aus den Stoffklassen der Polyhydroxyverbindungen und Zucker, Aminosäuren, Nucleoside, anionischen Verbindungen und/oder Vitamine, deren Verwendung in den bekannten Kulturmedien nicht üblich ist, enthalten. Die Bestandteile des erfindungsgemäß verwendeten Mediums sind in ihren Mengenverhältnissen so aufeinander abgestellt, daß die Konzentration der Komponenten im Medium weitgehend den natürlichen Konzentrationsbereichen des Plasmas angepaßt sind; vgl. Ciby-Geigy AG (Herausgeber) (1969) in Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage Geigy S.A., Basel.

Vorzugsweise ist das Zellkulturmedium frei von Tensiden, Schwermetallsalzen und Farbstoffen, die die Zellen schädigen und die Gewinnung der gewünschten Zellprodukte aus der Kulturlösung stören können.

Besonders bevorzugt ist für die Kultur der Zellen/-Leukozyten im Verfahren der Erfindung des Zellkulturmedium mit der in nachstehender Tabelle 1 angegebenen Zusammensetzung.

Zur Herstellung des Mediums wird Wasser mit der ATM-1-Qualität verwendet; vgl. ASTM D-1193-70 Standard-Specification for Reagent Water 1970; Annual Book of ASTM-Standards, Easton Maryland, ASTM 1970. Es ist darüber hinaus von möglichen Endotoxin-Kontaminationen durch Ultrafiltration an tensidfreien Membranen mit der Ausschlußgrenze von 10000 Daltons befreit. Das fertige Medium wird filtersterilisiert an tensidfreien Membranen mit  $\leq 0,2 \mu\text{m}$  Porengröße.

Tabelle 1

Nr.	Komponente	mol/l
1	KCl	5,0 m
2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 m
3	NaCl	120,0 m
4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8 m
5	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,8 m
6	L-Ascorbinsäure	0,2 m
7	Cholinchlorid	50,0 µ
8	2-Desoxy-D-ribose	5,0 µ
9	D-Galctose	0,5 m
10	D-Glucose	5,0 m
11	D-Glucurono-γ-lacton	0,1 m
12	Glycerin	50,0 µ
13	myo-Inosit	0,5 m
14	Na-Acetat	0,2 m
15	Na-Citrat	50,0 µ
16	Na-Pyruvat	0,1 m
17	D-Ribose	20,0 µ
18	Bernsteinsäure	0,1 m
19	Xylit	10,0 µ
20	D-Xylose	20,0 µ
21	CaCl <sub>2</sub>	2,0 m
22	MgCl <sub>2</sub>	1,0 m
23	NaHCO <sub>3</sub>	10,0 m
24	Humanes Serumalbumin	7,7 µ
25	Penicilin	1,0 µ
26	Streptomycin	2,0 µ
27	L-Glutamin	1,0 m
28	L-Alanin	0,2 m
29	L-Asparagin	0,1 m
30	L-Asparaginsäure	0,1 m

Nr.	Komponente	mol/l
31	L-Glutaminsäure	0,1 m
32	Glycin	0,2 m
33	L-Prolin	0,1 m
34	2L-Serin	0,1 m
35	L-Arginin	0,1 m
36	4-Aminobenzoesäure	2,0 $\mu$
37	L-Cystein	0,2 m
38	L-Histidin	0,1 m
39	L-Hydroxyprolin	10,0 $\mu$
40	L-Isoleucin	0,2 m
41	L-Leucin	0,2 m
42	L-Lysin-HCl	0,2 m
43	L-Methionin	0,1 m
44	L-Ornithin	50,0 $\mu$
45	L-Phenylalanin	0,1 m
46	Sarcosin	50,0 $\mu$
47	Taurin	0,1 m
48	L-Threonin	0,2 m
49	L-Tryptophan	50,0 $\mu$
50	L-Tyrosin	0,1 m
51	l-Valin	0,2 m
52	Glutathion reduziert	3,0 $\mu$
53	Carnosin	5,0 $\mu$
54	Mevalolacton	5,0 $\mu$
55	Adenin	50,0 $\mu$
56	Adenosin	50,0 $\mu$
57	Citidin	50,0 $\mu$
58	Guanin	5,0 $\mu$
59	Guanosin	20,5 $\mu$
60	Hypoxanthin	5,0 $\mu$
61	5-Methylcytosin	5,0 $\mu$

Nr.	Komponente	mol/l
62	Thymidin	20,0 $\mu$
63	Thymin	5,0 $\mu$
64	Uracil	5,0 $\mu$
65	Uridin	20,0 $\mu$
66	Xanthin	5,0 $\mu$
67	Biotin	1,0 $\mu$
68	C-Ca-pantothenat	5,0
69	Ergocalciferol	0,5 $\mu$
70	D, L-Carnitin	50,0 $\mu$
71	Folsäure	5,0 $\mu$
72	D, L- $\alpha$ -Liponsäure	2,0 $\mu$
73	Menadion	0,2 $\mu$
74	Nicotinsäureamid	20,0 $\mu$
75	Pyridoxal-HCl	5,0 $\mu$
76	Pyridoxin-HCl	2,0 $\mu$
77	Riboflavin	1,0 $\mu$
78	Rutin	5,0 $\mu$
79	Thiamin-HCl	5,0 $\mu$
80	D, L- $\alpha$ -Tocopherylacetat	1,0 $\mu$
81	Vitamin-A-acetat	1,0 $\mu$
82	Vitamin K	0,2 $\mu$
83	Vitamin B <sup>1</sup>	0,5 $\mu$
84	Vitamin U <sup>12</sup>	1,0 $\mu$
85	Chelesterin	1,0 $\mu$
86	Coenzym-Q <sub>10</sub>	0,1 $\mu$
87	Linolsäure	1,0 $\mu$
88	Linolensäure	5,0 $\mu$
89	Ölsäure	5,0 $\mu$
90	Äthanol	1,0 m
91	pH 7,10	--
92	Concanavalin A	50,0 n



Je nach der Art der gewünschten Produkte werden entweder gemischte Zell-/Leukozytenpopulationen oder einzelne Zell-/Leukozytenarten kultiviert. Die Herstellung und Kultur der Zellen bzw. Leukozyten muß unter sterilen Bedingungen erfolgen. Die Kultur wird ausreichend lange Zeit durchgeführt, um eine befriedigende Mediatorausbeute zu erhalten. Hierfür hat sich eine Dauer von etwa 10 bis 50 Stunden als geeignet erwiesen. Bei kürzeren Zeiten ist die Mediatorausbeute zu gering, so daß das Verfahren unwirtschaftlich ist. Bei einer Kulturdauer über etwa 50 Stunden ist andererseits das Medium erschöpft und die Zellen beginnen abzusterben, so daß eine Erhöhung der Ausbeute nicht mehr zu erwarten ist.

Die Kultur der Zellen bzw. Leukozyten wird bei einer Temperatur von etwa 30 bis 42 °C, vorzugsweise von etwa 37 °C durchgeführt. Bei niedrigeren Temperaturen ist der Kulturprozeß unbefriedigend, während bei Temperaturen über 42 °C die Zellen bzw. Leukozyten geschädigt werden.

Die Kultur wird mit einer Konzentration von etwa  $10^6$  bis  $5 \times 10^8$  Zellen/ml, vorzugsweise bis zu  $10^7$  bis  $10^8$  Zellen/ml durchgeführt. Bei niedrigeren Zellkonzentrationen ist die Ausbeute pro Volumeneinheit der Kulturlösung zu gering. Das Verfahren wird infolge zu großer Kulturvolumina unwirtschaftlich. Bei Zellkonzentration über  $5 \times 10^8$  Zellen/ml tritt sehr rasch Verarmung des Mediums an Nahrungsstoffen auf.

Die Kultur kann an der Atmosphäre durchgeführt werden. Vorzugsweise wird über die Kultur ein erhöhter Kohlendioxidpartialdruck aufrecht erhalten, der bis etwa 10 Vol%, insbesondere bis etwa 2 Vol% reichen

kann. Von großer Bedeutung ist die Sauerstoffversorgung der Kultur. Sie kann beispielsweise durch Einleiten von Luft sichergestellt werden. Um eine Kontaminierung der Kultur zu vermeiden, ist die zugeführte Luft vorzugsweise sterilisiert und hitzedekontaminiert, d.h. von Endotoxinen und anderen organischen Bestandteilen befreit. Die Lösung kann während der Kultur gerührt oder geschüttelt werden. Als Zellstimulans wird vorzugsweise ein Lektin, vorzugsweise aus *Canavalia ensiformis* (Con A) eingesetzt.

Zur Beendigung der Kultur werden die Zellen bzw. Leukozyten von der Kulturlösung abzentrifugiert, die anschließend auf die entstandenen Mediatoren aufgearbeitet wird. Um eine Schädigung der Zellen und damit eine Verunreinigung der Kulturlösung durch Zellbestandteile zu vermeiden, wird die Kultur bei verhältnismäßig niedriger Beschleunigung, d.h. etwa 300 bis 400 x g, zentrifugiert. Nach dem Abtrennen des Großteils der Zellen vom Überstand wird dieser zweckmäßigerweise bei höherer Beschleunigung erneut zentrifugiert, um restliche Schwebeteilchen zu entfernen. Die abgetrennten Zellen bzw. Leukozyten können entweder erneut kultiviert, kryopräserviert oder einer anderen Verwendung zugeführt werden.

Außer durch Kultur von Leukozyten können die bioaktiven RNP-Morphogene der Erfindung auch aus Entzündungsgewebe gewonnen werden. Dort entstehen sie durch die Ansammlung der Leukozyten infolge des durch die Gewebeschädigung ausgelösten Entzündungsprozesses. Das Entzündungsgewebe kann in üblicher Weise gewonnen und für die Präparation der RNP verwendet werden. Dazu wird das Entzündungsgewebe in Pufferlösung homogenisiert und die löslichen Bestandteile (Exsudat)

werden von den unlöslichen Strukturbestandteilen des Gewebes getrennt.

Vorzugsweise wird entzündetes infarziertes Herzmuskelgewebe verwendet, welches durch Ligation des linken vorderen absteigenden Astes der linken Koronararterie mittels einer transfemorale Kathedertechnik während 24 Stunden gebildet wird. Der Leukozyten enthaltende, entzündete Herzmuskelteil wird bei 0 bis 4 °C von nicht infarktiertem, gesunden Gewebe abgetrennt.

Für die Isolierung und Gewinnung des bioaktiven RNP der Erfindung ist die Aufarbeitung eines sehr großen Kulturlösungsvolumens erforderlich. Zu Beginn des Reinigungsverfahrens ist es deshalb aus praktischen Gründen notwendig, eine möglichst effektive Verminderung des zu behandelnden Volumens durchzuführen. Die Kulturlösung enthält neben den geringen Mengen an erzeugten Substanzen, darunter hauptsächlich Proteine, das Gemisch der Bestandteile des Mediums. Vorteilhafterweise wird deshalb im ersten Schritt der Reinigung eine Abtrennung der entstandenen Proteine von den Bestandteilen des Mediums und gleichzeitig von dem großen Volumen der wäßrigen Lösung durchgeführt. Dies kann durch eine selektive Aussalzung der Proteine aus der Kulturlösung bewirkt werden, die beispielsweise durch Zugabe eines Sulfates oder Phosphates erreicht wird. Nachstehend wird die Fällung der Proteine am Beispiel der Aussalzung durch Zugabe von Ammoniumsulfat zu der Kulturlösung beschrieben.

Durch Sättigung der Kulturlösung mit Ammoniumsulfat wird der Großteil der entstandenen Proteine zusammen mit gegebenenfalls enthaltenem Serumalbumin ausge-

fällt. Nach dem Abtrennen des Substanzniederschlags, beispielsweise durch Zentrifugieren, kann dieser in der nachstehend beschriebenen Weise in seine einzelnen Komponenten aufgetrennt und die enthaltenen bioaktiven RNP gewonnen werden. Der erhaltene Überstand enthält neben den löslichen Bestandteilen des Mediums auch den in gesättigter Ammoniumsulfatlösung löslichen Teil der Substanzen, unter denen sich auch ein Teil der bioaktiven RNP befindet. Der Überstand wird konzentriert und die enthaltenen Substanzen werden daraus in der nachstehenden Weise gewonnen. Wenn die proteinhaltige Kulturlösung mit Ammoniumsulfat bis zur Sättigung versetzt wird, fällt der größere Teil der begleitenden Proteine aus. Auf diese Weise wird ein Proteingemisch erhalten, das aus einer Anzahl verschiedener Proteine besteht und dessen Trennung in die einzelnen Komponenten infolgedessen mühsam ist. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung wird das in der Kulturlösung enthaltene Proteingemisch deshalb bereits in der Fällungsstufe in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Diese Auftrennung in mehrere Proteinfaktionen ist möglich, da die einzelnen Proteine bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen ausgefällt werden. Vorzugsweise wird die Kulturlösung im Verfahren der Erfindung deshalb stufenweise mit Ammoniumsulfat bis zu bestimmten Sättigungsgraden versetzt, wobei in jeder Fraktion der Teil der Proteine ausfällt, dessen Löslichkeitsprodukt unterhalb des jeweiligen Sättigungsgrades liegt. Durch geeignete Wahl der Sättigungsgrenzen der einzelnen Fraktionen kann im Verfahren der Erfindung eine grobe Auftrennung in Gruppen von Proteinen bereits bei der Fällung erzielt werden.

Beispielsweise wird die Kulturlösung zunächst bis zu einer Sättigung von 35 % mit Ammoniumsulfat versetzt. Der erhaltene Proteinniederschlag wird abgetrennt. Danach wird der Sättigungsgrad der überstehenden Lösung auf 45 % erhöht. Es bildet sich erneut ein Proteinniederschlag, der abgetrennt wird. Anschließend wird die überstehende Lösung auf einen Sättigungsgrad von 90 % eingestellt. Der dabei erhaltene Proteinniederschlag wird ebenfalls abgetrennt. Die überstehende Lösung dieser Fällung wird beispielsweise durch Entwässerungs-Dialyse oder Ultrafiltration konzentriert.

Die Salzfällung der Proteine wird ebenso wie die nachfolgende Reinigung vorzugsweise bei einer Temperatur von etwa 0 bis 10 °C, insbesondere etwa 0 bis 4 °C durchgeführt. Die für die Reinigung verwendeten Lösungen besitzen einen pH-Wert zwischen 5 und 9, insbesondere zwischen 6 und 8. Um eine pH-Konstanz der Lösung zu erreichen, wird vor der Salzfällung vorzugsweise ein starker Puffer, z.B. 0,1 mol/l Phosphatpuffer, zugesetzt. Zur Aufrechterhaltung des Redoxpotentials der Proteine wird den Lösungen vorzugsweise Cystein in einer Menge von 0,001 mol/l zugesetzt. Sterile Bedingungen für die Proteinreinigung sind nicht erforderlich.

Die bei der Salzfällung erhaltenen Proteine können nach Auflösen in einem Proteine nicht schädigenden Medium direkt der nachstehend beschriebenen Reinigung und Auftrennung zugeführt werden. Der Überstand der letzten Fällungsstufe wird konzentriert, beispielsweise durch Entwässerungsdialyse oder Ultrafiltration. Dabei werden alle Verbindungen mit einem Molekulargewicht von größer als etwa 300 bis 500 Dal-

tons, d.h. auch die Proteine und Peptide dieser Fraktion, als Retentat quantitativ erhalten.

Die in der vorstehend beschriebenen Stufe erhaltenen Proteinfraktionen enthalten die bioaktiven RNP der Erfindung im Gemisch mit zahlreichen Fremdproteinen (andere sezernierte Proteine gegebenenfalls Serumalbumin und gegebenenfalls CON). Die Fremdproteine liegen in den Gemischen in weit überwiegender Menge vor. Durch eine Reihe von Reinigungsschritten müssen die bioaktiven RNP angereichert und von den Fremdproteinen soweit befreit werden, daß diese ihre molekulare biologische Spezifität nicht mehr stören. Die bioaktiven RNP selbst sind ebenfalls eine Stoffklasse, die in ihre einzelnen, spezifisch wirkenden Individuen aufgetrennt wird.

Allgemein bestehen Reinigungsverfahren für Eiweißkörper (Proteine) und andere Naturstoffe aus einer Sequenz kombinierter Trennungsverfahren, welche Molekülgrößen-, Ladungs-, Form-, Strukturstabilitäts- und Moleküloberflächenbeschaffenheitsunterschiede zwischen dem gesuchten Wirkstoff und den begleitenden Fremdstoffen zur Trennung ausnutzen. Dementsprechend können zahlreiche Kombinationen verschiedenster Trennungsverfahren zur Reinigung eines Proteins erarbeitet werden. Für die Handhabungseigenschaften, technische Ausführbarkeit, Automatisierbarkeit und Wirtschaftlichkeit eines Reinigungsverfahrens sowie für die Qualität des gesuchten Naturproduktes ist deshalb nicht allein die Art der verwendeten Trennungsschritte von Bedeutung, sondern insbesondere deren optimierte Gestaltung und deren sinnvolle Kombination in einer Reinigungssequenz innerhalb des Rahmens der Strukturstabilität und der anderen Strukturparameter des ge-

suchten Wirkstoffes. Das heißt auch, daß selbst die Benutzung gleicher oder ähnlicher Trennungsprinzipien (z.B. Molekularsiebfiltration, Dialyse, Ionenaustauschadsorption, usw.), aber in unterschiedlicher Kombination, für die Handhabungsfähigkeit und Wirtschaftlichkeit des Reinigungsverfahrens entscheidend sein können. In bestimmten Fällen ist die Benutzung oder Unterlassung einer einzigen Technik (z.B. Hydroxylapatitchromatographie, Zonenpräzipitationschromatographie, usw.) an einer bestimmten Stelle der Reinigungssequenz, oder innerhalb einer begrenzten Teilsequenz, von ausschlaggebender Bedeutung für die Qualität des gesuchten Wirkstoffes sowie für die Handhabungsfähigkeit und die Wirtschaftlichkeit seines Reinigungsverfahrens. Klar aufgezeigt werden diese allgemeinen Zusammenhänge und Grundprinzipien der Naturstoffreinigung beispielsweise an der allgemein bekannten Tatsache, daß in einem wirtschaftlich vernünftigen und technisch handhabungsfähigen Naturstoffreinigungsverfahren ein säulenchromatographischer Reinigungsschritt oder ein Lyophilisierungsschritt nicht sinnvoll ist, bevor das Gesamtausgangsvolumen oder die Ausgangskonzentration der begleitenden Fremdbestandteile des Wirkstoffrohextraktes nicht auf mindestens 1/500 bis 1/1000 durch andere Verfahrensschritte reduziert wurde.

Für die Reinigung der einzelnen Proteinfractionen bieten sich eine Mehrzahl von an sich einzeln in der Biochemie bekannten Reinigungsschritten an. Beispiele für solche Reinigungsschritte sind: Präparative und analytische Molekularsiebfiltration, Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie, bzw. Eintopfadsorptionsverfahren, Chromatographie an Hydroxylapa-

tit, Zonenpräzipitationschromatographie und Kreislauf- oder Kaskadenmolekularsiebfiltration.

Bereits durch einmalige Durchführung eines der genannten Reinigungsverfahren kann eine beträchtliche Menge an Begleitproteinen von den bioaktiven RNP abgetrennt werden. Jedoch haften die in den Fraktionen enthaltenen Substanzen trotz ihres verschiedenen Molekulargewichts häufig sehr stark aneinander. Sie werden beispielsweise in der Molekularsiebfiltration durch das Bestehen nicht idealer Gleichgewichte bei Proteinpolyelektrolyten oft unvollständig entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt. Es empfiehlt sich deshalb, mindestens zwei der genannten Trennverfahren hintereinander durchzuführen. Vorzugsweise werden die bioaktiven RNP enthaltenden Proteinfraktionen mindestens drei der genannten Reinigungsschritte nacheinander unterzogen.

Alle Kombinationen der erwähnten Trennschritte sind Gegenstand des erfindungsgemäßen Verfahrens. Dabei gehört es zum Kenntnisstand des Fachmanns, daß bestimmte Folgen von Trennschritten weniger sinnvoll sind als andere Kombinationen. Beispielsweise ist dem Fachmann bewußt, daß bei Durchführung einer präparativen Molekularsiebfiltration nach einer analytischen Molekularsiebfiltration neben der unhandlichen Verfahrensweise auch ein schlechteres Gesamtergebnis in Bezug auf die Trennwirkung erhalten wird als bei umgekehrter Reihenfolge.

Die Molekularsiebfiltration bewirkt eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht. Da ein überwiegender Teil der begleitenden Fremdproteine ein anderes Molekulargewicht als die bioaktiven RNP



aufweist, kann ihre Abtrennung auf diese Weise erreicht werden. Für die Trennung der Substanzen nach ihrem Molekulargewicht wird ein hydrophiles, in Wasser quellendes Molekularsieb verwendet. Beispiele für geeignete Molekularsiebe sind mit Epichlorhydrin vernetzte Dextrane (Sephadex), mit Acrylamid vernetzte Agarosen (Ultrogele) und raumvernetzte Acrylamide (Biogele), deren Ausschlußgrenzen größer als die zur Auftrennung verwendeten Separationsgrenzen sind.

Die Molekularsiebfiltration wird, falls mehrere Trennstufen zur Anwendung kommen, vorzugsweise als einer der Ersten durchgeführt. Je nach dem Längen-Durchmesser-Verhältnis der verwendeten Säule und dem Teilchendurchmesser der Gelmatrix, welche die theoretische Bodenzahl der Säule beeinflussen, wird die Molekularsiebfiltration als "präparativ" oder "analytisch" bezeichnet. Sie wird als "präparativ" bezeichnet, wenn die Chromatographie an Säulen mit einem Dimensionsverhältnis Länge: Durchmesser bis 10:1 und einer Beladung von bis zu 1/3 des Säuleninhalts bzw. unter voller Ausnutzung des gesamten, matrizentypischen Separationsvolumens durchgeführt wird. "Analytisch" bedeutet ein Längen-Durchmesser-Verhältnis über 10:1, vorzugsweise etwa 50:1, und eine Beladung bis maximal 3 % des Säuleninhaltes, auch bei HPLC-Versionen.

Bei der präparativen Molekularsiebchromatographie werden Gelmatrizen mit möglichst großer Teilchengröße benutzt, um schnelle Durchflußraten der oft etwas viskosen Proteinlösungen bei möglichst niedrigen Drucken zu erzielen. Bei der analytischen Molekularsiebfiltration wird die Teilchengröße der Gelmatrix so klein wie möglich gewählt, um eine maximale theo-

retische Bodenzahl der Säule bei technisch und sicherheitsmäßig verwertbarem Druck und einer Flußgeschwindigkeit der mobilen Phase von 2 bis 4 cm/h zu erreichen. Diese Parameter sind von der Gelmatrixstruktur abhängig und von Gel zu Gel verschieden.

Falls mehrere präparative Molekularsiebfiltrationen nacheinander durchgeführt werden, kann die Separationsgrenze abgestuft gewählt werden. Daran anschließend kann eine analytische Molekularsiebfiltration mit entsprechend abgestuften Separationsgrenzen durchgeführt werden. Die Ausschlußgrenze des verwendeten Gels muß jedenfalls größer als etwa 10000 Daltons sein, um eine Volumenverteilung der RNP zwischen der stationären Gelmatrixphase und der mobilen wäßrigen Pufferphase zu ermöglichen.

Die "Ausschlußgrenze" bezeichnet den hydrodynamischen Parameter eines gelösten Teilchens, welcher der Porengröße der Gelmatrix entspricht. Teilchen mit größerem hydrodynamischen Parameter können nicht mehr in die Gelmatrix eindringen (Volumenverteilungskoeffizient  $K_D = 0$ ). Die "Separationsgrenze" bezeichnet einen zur Trennung von gelösten Teilchen zweckmäßigerweise festgesetzten hydrodynamischen Parameter, der zwischen einem Volumenverteilungskoeffizienten  $K_D = 0$  und  $K_D = 1$  liegt.

Zur Molekularsiebfiltration werden die Substanzen gelöst in einer die Substanzen nicht schädigenden Flüssigkeit auf das Molekularsieb aufgebracht. Ein spezielleres Beispiel für ein geeignetes Lösungsmittel ist 0,003 mol/l Natriumkaliumphosphatlösung mit einem Gehalt von 0,3 mol/l NaCl und 0.001 mol/l Cystein und einem pH-Wert von 7,4. Nach der Filtration

werden die RNP enthaltenden Fraktionen in der nachstehend beschriebenen Weise konzentriert, und gegebenenfalls einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen.

Die Anionenaustauscher für die Reinigung der Substanzen eignen sich beispielsweise mit Epichlorhydrin vernetzte Dextran-(Sephadex) oder Zellulosematrizen, an welche funktionelle Gruppen mit Anionenaustauscherkapazität gekoppelt sind. Sie können nach Verwendung durch Regeneration wiederholt gebraucht werden. Bevorzugt wird ein in einer Pufferlösung vorgequollener und äquilibrierter schwacher Anionenaustauscher in der  $\text{Cl}^-$ -Form, wie DEAE-Sephadex-A 50, verwendet und die Behandlung bei einem pH-Wert von 8 bis 10 durchgeführt. Ein spezielles Beispiel für eine solche Pufferlösung ist 0,01 mol/l Tris-HCl, welche 0,04 mol/l NaCl und 0,001 mol/l Cystein enthält und einen pH-Wert von 8,0 hat.

Bei der Verwendung des Anionenaustauschers wird die Substanzfraktion einer solchen Menge Anionenaustauscher zugesetzt, die zur vollständigen Adsorption der RNP und der positiv adsorbierenden Begleitproteine ausreicht. Üblicherweise genügen dazu zwei Volumenteile gequollener Anionenaustauscher pro Volumen konzentrierter Proteinfraction. Die Reaktion kann entweder als Chromatographieverfahren oder als leichter handhabbares Eintopfadsorptionsverfahren gestaltet werden. Im Eintopfverfahren wird die überstehende Flüssigkeit mit den negativ adsorbierten Proteinen von dem mit den positiv adsorbierten RNP und andere Substanzen beladenen Anionenaustauscher, beispielsweise durch Filtrieren (in der Chromatographiesäule), Dekantieren oder Zentrifugieren (im Eintopfverfahren) abgetrennt. Der beladene Anionenaustauscher wird

durch Waschen mit Wasser oder einer Salzlösung, welche eine zu 0,04 mol/l NaCl äquivalente maximale Ionenstärke hat, vorzugsweise höchstens etwa 15 °C von anhaftenden, negativ adsorbierten Verbindungen befreit. Ein spezielles Beispiel für eine zum Auswaschen geeignete Salzlösung ist die erwähnte Tris-HCl-Pufferlösung vom pH-Wert 8,0.

Der von negativ adsorbierten Verbindungen befreite, mit RNP und anderen Substanzen beladene Anionenaustauscher wird nun mit einer Proteine nicht schädigenden wäßrigen Salzlösung eluiert, welche eine größer als 0,04 mol/l NaCl entsprechende Ionenstärke und einen pH-Wert zwischen 4,0 und 10,0 hat. Vorzugsweise wird eine Salzlösung hoher Ionenstärke mit einem pH-Wert von 5,0 bis 7,0 verwendet. Ein spezielles Beispiel für eine derartige Salzlösung ist eine 2,0 mol/l NaCl-Lösung, welche mit 0,01 mol/l Piperazin-HCl vom pH-Wert 6,5 gepuffert ist und welche 0,001 mol/l Cystein enthält.

Wird die Anionenaustauscherreaktion als Chromatographieverfahren gestaltet, so kann die Elution der RNP und anderen Substanzen auch durch einen linearen NaCl-Konzentrationsgradienten erfolgen.

Als Kationenaustauscher eignen sich für die Reinigung der Proteinfraction beispielsweise mit Epichlorhydrin vernetzte Dextran-(Sephadex) oder Zellulosematrizen, an welche funktionelle Gruppen mit Kationenaustauscherkapazität gekoppelt sind. Sie können nach Verwendung durch Regeneration wiederholt gebraucht werden. Bevorzugt wird ein schwach saurer Kationenaustauscher in der  $\text{Na}^+$ -Form, wie CM-Sephadex C-50, verwendet, und die Behandlung bei einem pH-Wert von 4

bis 6 durchgeführt. Die Substanzfraktionen können zur Erleichterung der Einstellung der Beladungsgleichgewichte vor der Behandlung mit dem Kationenaustauscher mit einer Proteine nicht schädigenden Salzlösung verdünnt werden, welche eine zu 0,04 mol NaCl/Liter äquivalente maximale Ionenstärke hat. Sie kann gleichzeitig zur Einstellung des pH-Wertes dienen. Ein spezielles Beispiel für eine derartige Salzlösung ist eine 0,001 mol/l Kaliumphosphat-Acetatpufferlösung mit einem Gehalt von 0,04 mol/l NaCl und einem pH-Wert von 4 bis 6. Diese Kationenaustauscherreaktion kann sowohl als Chromatographieverfahren als auch als technisch leicht handhabbares Eintopfverfahren gestattet werden.

Der Kationenaustauscher wird der Substanzfraktion in einer Menge zugesetzt, die ausreicht, um die Proteinfraction zu adsorbieren. Üblicherweise genügen dazu etwa 2 Volumenteile gequollener Ionenaustauscher pro Volumenteil Proteinfraction. Sodann wird die überstehende Flüssigkeit von dem mit den Substanzen beladenen Kationenaustauscher, beispielsweise durch Dekantieren oder Zentrifugieren, abgetrennt. Der beladene Kationenaustauscher wird durch Waschen mit Wasser oder einer Salzlösung, welche eine in 0,04 mol/l NaCl äquivalente maximale Ionenstärke hat, vorzugsweise bei einem pH-Wert von etwa 4 bis 6 und einer Temperatur von vorzugsweise höchstens etwa 15 °C von anhaftenden, nicht adsorbierten Verbindungen befreit. Ein spezielles Beispiel für eine zum Auswaschen geeignete Salzlösung ist die erwähnte Kaliumphosphat-Acetat-Pufferlösung vom pH-Wert 5,0.

Der von negativ adsorbierten Verbindungen befreite, mit den Substanzen beladene Kationenaustauscher wird

nun mit einer Proteine und Nukleinsäuren nicht schädigenden wäßrigen Salzlösung eluiert. Vorzugsweise wird hierzu eine Salzlösung hoher Ionenstärke mit einem pH-Wert von etwa 4 bis 10 verwendet. Spezielle Beispiele für derartige Salzlösungen sind eine wäßrige 0,5 mol/l Kaliumphosphatlösung vom pH-Wert 6,5 bis 7,5 oder eine 2 bis 5 mol/l Natriumchloridlösung vom gleichen pH-Wert.

Für die Chromatographie an Hydroxylapatit werden möglicherweise aus vorangegangenen Schritten vorhandene Salze, z.B. Ammoniumsulfat und vor allen Phosphate, vorzugsweise durch Dialyse oder Ultrafiltration an einer Membran mit einer Ausschlußgrenze von 500 Daltons, vor dem Aufbringen auf den Hydroxylapatit entfernt. Abgesehen von der Viskositätserhöhung durch Fremdzusätze ist aber für das Gelingen der Chromatographie an Hydroxylapatit lediglich die Phosphatkonzentration der Proteinlösung kritisch. Die Eluierung der Substanzen erfolgt durch einen Kaliumphosphat-Konzentrationsgradienten, der vorzugsweise linear ist. Die RNP enthaltenden Fraktionen werden gesammelt und in der nachstehend erwähnten Weise konzentriert.

Die Verwendung von Hydroxylapatit ist für die strukturschonende Reingewinnung des metallhaltigen RNP von wesentlicher Bedeutung. Aus technischen und wirtschaftlichen Gründen ist es aber mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, größere Substanzvolumina an Hydroxylapatitsäulen zu chromatographieren. Einerseits neigt nämlich Hydroxylapatit bei größeren Substanzvolumina sehr stark zur Verstopfung und wird dadurch unbrauchbar. Andererseits ist Hydroxylapatit teuer, was seinem Einsatz in größerem Maßstab entgegensteht. Aus diesen Gründen ist es im erfindungsge-

mäßen Verfahren bevorzugt, aus den Substanzfraktionen, in denen die bioaktiven RNP als Spuren enthalten sind, bereits vor der Chromatographie an Hydroxylapatit einen Großteil der begleitenden Fremdproteine durch geeignete Verfahrensschritte abzutrennen und dadurch das Proteinvolumen, das auf die Hydroxylapatitsäule aufgebracht werden muß, entscheidend zu verkleinern.

Bei der Zonenpräzipitationschromatographie (vgl. J. Porath, Nature, Bd. 196 (1962), S. 47-48) werden Proteinverunreinigungen der bioaktiven RNP durch Aus-salzfractionierung der Proteine mittels eines Salzkonzentrationsgradienten abgetrennt.

Grundprinzip der Proteintrennung mittels der Zonenpräzipitationschromatographie sind unterschiedliche, strukturgegebene reversible Löslichkeitseigenschaften der Proteine und RNP. Sie gehören zu den empfindlichsten molekularen Trennparametern und wurden häufig als Kriterium für den Nachweis der molekularen Einheitlichkeit eines Proteins verwendet. Dabei können Temperaturen und pH-Wert, Dimension der Säule, Art des Salzes, Form des Gradienten und Beladung der Säule in einem verhältnismäßig breiten Bereich variiert werden.

Die Temperatur bei der Zonenpräzipitationschromatographie kann etwa 0 bis 40 °C betragen. Bevorzugt ist ein Temperaturbereich von etwa 0 bis 10 °C, insbesondere etwa 4 bis 6 °C. Der pH-Wert kann zwischen etwa 4 und 10 liegen; bevorzugt ist ein pH-Wert im Bereich von 6 bis 8, insbesondere etwa 7. Das Verhältnis von Länge: Durchmesser der verwendeten Säule

soll größer als etwa 10 : 1 sein, bevorzugt ist ein Verhältnis von 30 bis 100 : 1, insbesondere etwa 50 : 1. Als Salze kommen alle Proteine und Nukleinsäuren nicht schädigenden Salze zur Ausführung in Frage. Beispiele für solche Salze sind Natriumkaliumphosphat, Ammoniumsulfat und Natriumsulfat. Bevorzugt wird Ammoniumsulfat verwendet.

Der Salzkonzentrationsgradient kann jede beliebige Form haben, so lange die Aussalzpunkte der Proteine lafstreckenmäßig getrennt sind. Bevorzugt sind lineare Konzentrationsgradienten, insbesondere ein ansteigender linearer Konzentrationsgradient von 25 bis 100 % Ammoniumsulfatsättigung. Die Beladung der Säule beträgt höchstens etwa 5 %, vorzugsweise etwa 1 %.

Die Kreislauf- oder Kaskadenmolekularsiebfiltration kann unter den Bedingungen durchgeführt werden, die vorstehend für die analytische Molekularsiebfiltration beschrieben sind. Es können die gleichen Molekularsiebe und die gleichen Säulenbedingungen verwendet werden. Bevorzugt ist Sephadex G 50 bei einem Längedurchmesser-Verhältnis der Säule von mindestens etwa 50 : 1 und einer Beladung von höchstens etwa 3 % des Säuleninhaltes. Als Lösungsmittel und zur Eluierung werden vorzugsweise die bei der analytischen Molekularsiebfiltration benutzten Lösungsmittel eingesetzt.

Bei der Kreislaufmolekularsiebfiltration wird das Eluat bei den festgelegten Separationsgrenzen im Kreislauf wieder in die gleiche Säule geleitet. Auf diese Weise wird die Laufstrecke der Moleküle differentiell verlängert. Bei einer anderen Ausführungsform, der Kaskadenmolekularsiebfiltration, wird das Eluat bei den festgelegten Separationsgrenzen auf



eine neue Säule mit gleichen oder ähnlich definierten Parametern geleitet.

Zwischen den vorstehend erläuterten Reinigungsschritten können die erhaltenen, bioaktive RNP-enthaltenden Substanzlösungen zu nachfolgenden Auftrennungen der Proteine/RNP von unerwünschten Salzen gereinigt und konzentriert werden. Diese Konzentration (Abtrennen des Großteils der wäßrigen Salzlösung von den Substanzen kann auf verschiedene Weise erfolgen. Beispielsweise können die bioaktiven RNP und die Begleitsubstanzen durch Ultrafiltration oder Entwässerungsdialyse an einer Membran mit der Ausschlußgrenze 500 Daltons oder durch Lyophilisieren konzentriert werden. Dazu kann auch eine Molekularsiebfiltration durch Wahl der entsprechenden mobilen Phase in üblicher Weise modifiziert angewendet werden. Bei den Molekularsiebfiltrationen wird der Substanzlösung vorzugsweise etwa 0,4 mol/l Ammoniumsulfat zugesetzt. Im Gegensatz zu höheren Konzentrationen hat das Ammoniumsulfat in dieser Konzentration einen starken Ein-salzeffekt gegenüber Proteinen. Durch diese Maßnahmen werden demnach die Proteine während der Molekular-siebfiltration in Lösung gehalten. Ferner verhindert Ammoniumsulfat das bakterielle Wachstum und hemmt gewisse Enzyme. Dadurch trägt es zur Stabilisierung der bioaktiven RNP bei, vor allem wenn die Chromatographie bei höheren Temperaturen (über etwa 20 °) und unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt wird.

Die Temperatur und pH-Bedingungen sind bei der Durchführung der Reinigungsschritte nicht besonders kritisch. Wenn die Erhaltung der nativen Konformation der Substanzen beabsichtigt ist, empfiehlt sich die Einhaltung einer Temperatur im Bereich von etwa 0 bis

8 °C, vorzugsweise etwa 0 bis 4 °C. Ferner müssen die Trenn- und Reinigungsstufen unter im wesentlichen physiologischen pH- und Salzbedingungen durchgeführt werden. Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Einhaltung dieser Bedingungen erstmals leicht möglich ist. Zur Oxidationsverhinderung wird die Substanzlösung vorzugsweise ferner mit etwa 0,001 mol/l Cystein versetzt.

Die erhaltenen bioaktiven RNP können in einer gepufferten physiologischen Salzlösung, beispielsweise in 0,0015 mol/l Natriumkaliumphosphatlösung, die 0,15 mol/l (0,9 %) NaCl und 0,001 mol/l Cystein enthält und einen pH-Wert von 7,4 aufweist, nach üblicher Filtersterilisation (0,2 µm Porenweite) nativ und biologisch aktiv auch bei Raumtemperatur (für mindestens 200 Stunden) oder eingefroren bei -25 °C (für mindestens 5 Jahre) aufbewahrt werden. Diese Stabilität der bioaktiven RNP kann unter anderem als eines der Kriterien für ihren hochreinen Zustand angesehen werden.

Die erfindungsgemäßen RNP können auch unter Verwendung chemisch oder biologisch synthetisierter Teilsequenzen oder Teilen und homologen Sequenzen davon hergestellt werden. Bevorzugt ist, daß man die chemisch oder biologisch synthetisierten Oligonukleotid- oder Antisensenukleotidsequenzen in vivo oder in vitro, welche die nach Anspruch 1 gegebenen Teilsequenzen codieren, mit mindestens 6 Basen in der PCR-Reaktion einsetzt oder die Antisense-Bioprozeßtechnik einsetzt.

Die Beispiele erläutern die Erfindung. In den Beispielen wird die Gewinnung der RNP-Morphogene ausge-

hend von Leukozyten aus Schweineblut beschrieben. Die Erfindung ist jedoch nicht auf diese Ausführungsform beschränkt. Es können auch Zellen des retikulo-endothelialen Systems bzw. Entzündungs-, Wundgewebe oder -flüssigkeit (Exsudat) anderer Säuger verwendet werden.

B e i s p i e l 1

Es wird die Herstellung von bioaktiven RNP aus einer Kulturlösung einer gemischten Leukozytenpopulation und die Abtrennung des Monocyto-CuRNP von den übrigen Bestandteilen der Kulturlösung erläutert. Sämtliche Arbeitsschritte werden bei 0 bis 8 °C in Gegenwart von 0,001 mol/ Cystein durchgeführt, sofern nichts anderes angegeben ist. Die Zentrifugationen erfolgen wie beschrieben, entweder einstufig oder zweistufig (als Durchflußzentrifugation).

50 kg (etwa  $10^{14}$ ) Leukozyten werden als gemischte Zellpopulation physiologischer Zusammensetzung aus 10 000 Liter Schweineblut isoliert und in 20 Chargen zu 2,5 kg (etwa  $5 \times 10^{12}$  Zellen) unter sterilen Bedingungen kultiviert. Als Kulturlösung wird z.B. das in Tabelle 1 aufgeführte Medium verwendet. Pro Charge werden 50 l Kulturmedium eingesetzt. Die Kultur wird in Glasgefäßen ausgeführt. Die Zelldichte beträgt anfangs  $10^8$  Zellen/ml. Die Kultur wird bei 37 °C in einer Atmosphäre von 1 v/v % CO<sub>2</sub> für 40 Stunden aufrechterhalten. Während dieser Zeit wird die Zellsuspension langsam gerührt (60 U.p.M.) und mit sterilen, pyrogenfreien wassergewaschenen, bei etwa 500 °C in einem Quarzrohr hitzedekontaminierten, feinen (kleiner als 1 mm) Luftblasen (etwa 5 l Luft/Std.) durchflutet. Zusätzlich zum Sauerstoffpartialdruck wird der pH-Wert (7,1) und der D-Glucosespiegel gemessen und konstant gehalten. Durch den Gehalt des Kulturmediums an einem polyvalenten Lektin (CON) werden die Zellen während der Kultur stimuliert. Zahl, Differential und morphologische Lebensfähigkeit (Farbstoffausschlußtest) der Zellen werden laufend mit üblichen Methoden der Hämatologie und Zellkulturtechnik be-

stimmt. Die funktionelle Lebensfähigkeit der Zellen wird aufgrund ihrer Motilität und Stimulierbarkeit mit chemokinetischen und chemotaktischen Proteinen gemessen. Mitosen werden durch Chromosomenzählung bestimmt. Die morphologische Lebensfähigkeit der Zellen am Ende der biotechnischen Kultur ist > 85 %. Der gesamte Zellverlust (hauptsächlich Granulozyten) während der Kultur liegt bei höchstens 20 %, was für primäre Zellkulturen normal ist.

Die Kultur wird durch Trennung der Zellen von der überstehenden Lösung durch 10 Minuten Zentrifugieren bei 500 x g und 10 °C beendet. Die Zellen werden zweimal mit einer Salzlösung gewaschen, die 0,15 mol/l NaCl und 0,0015 mol/l Natriumkaliumphosphat enthält, und den pH-Wert 7,1 aufweist. Sie können anderweitig verwendet werden.

Die Kulturlösung wird sodann bei 10 000 x g 1 Stunde lang bei 4 °C zur Entfernung von Schwebeteilchen erneut zentrifugiert. Die erhaltene klare Kulturlösung (zusammen 1000 l mit einem Gehalt von etwa 1400 g Proteinen und anderen Makromolekülen) wird unmittelbar der Aussalzfraktionierung mit Ammoniumsulfat unterworfen.

#### 1. Schritt der Reinigung (Aussalzfraktionierung)

Die Kulturlösung wird mit 0,5 mol/l Natriumkalium-Phosphat-Pufferlösung bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mol/l versetzt. Ferner wird festes L-Cystein bis zu einer Konzentration von 0,001 mol/l zugesetzt.

Dann wird die Kulturlösung durch Zugabe von 199 g Ammoniumsulfat/l Lösung auf eine Ammoniumsulfat-Sät-

tigungskonzentration von 35 % eingestellt. Während der Zugabe wird der pH-Wert der Lösung laufend kontrolliert und durch Zusatz von 2 n Ammoniak auf 6,7 gehalten. Ein Teil der Proteine fällt aus der Lösung aus. Der Proteinniederschlag wird durch einstündiges Zentrifugieren bei 10 000 x g vom gelöste Substanzen enthaltenden Überstand abgetrennt. Es wird die Proteinfraktion 1 als ammoniumsulfathaltiger Proteinschlamm erhalten, der etwa 100 g Protein enthält.

Anschließend wird die Kulturlösung durch Zugabe von 60 g Ammoniumsulfat/l Lösung auf eine Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration von 45 % eingestellt. Während der Zugabe wird der pH-Wert der Lösung laufend kontrolliert und durch Zusatz von 2 n Ammoniak auf 6,7 gehalten. Ein weiterer Teil der Proteine fällt aus der Lösung aus. Der Proteinniederschlag wird durch einstündiges Zentrifugieren bei 10 000 x g vom gelöste Substanzen enthaltenden Überstand abgetrennt. Es wird die Proteinrohfraktion 2 als ammoniumsulfathaltiger Proteinschlamm erhalten, der etwa 60 g Protein enthält. Die Proteinrohfraktion 2 kann ebenfalls getrennt und nach dem nachstehend angegebenen Verfahren zur Gewinnung ihrer Inhaltsstoffe aufgearbeitet werden.

Sodann wird die Kulturlösung durch Zugabe von 323 g Ammoniumsulfat/l Lösung auf eine Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration von 90 % eingestellt. Während der Zugabe wird der pH-Wert der Lösung laufend kontrolliert und durch Zusatz von 2 n Ammoniak auf 6,7 gehalten. Ein weiterer Teil der Proteine fällt aus der Lösung aus. Der Proteinniederschlag wird durch einstündiges Zentrifugieren bei 10 000 x g vom gelöste Substanzen enthaltenden Überstand abgetrennt. Es

wird die Proteinrohfraktion 3 als ammoniumsulfathaltiger Proteinschlamm erhalten, der etwa 1080 g Protein enthält. In dieser Fraktion befindet sich auch der Großteil des Serumalbumins. Die Proteinrohfraktion 3 wird ebenfalls nach dem nachstehend angegebenen Verfahren zur Gewinnung ihrer Inhaltsstoffe aufgearbeitet. Der Überstand 4 der Rohfraktion enthält 160 g Protein und andere Makromoleküle. In diesem Überstand befinden sich bioaktive monozytäre RNP.

Der proteinhaltige Überstand 4 wird mit dem gleichen Volumen Pufferlösung A (0,15 mol/l NaCl, 0,0015 mol/l Natriumkaliumphosphat, 0,001 mol/l L-Cystein; pH 7,4) auf einen Ammoniumsulfat-Sättigungsgrad von 45 % und eine Phosphatkonzentration von 0,05 mol/l verdünnt. Diese Lösung wird über einer Membran mit der Ausschlußgrenze 500 Daltons konzentriert. Die in der Lösung enthaltenen Substanzen werden als Retentatlösung mit einem Volumen von 13 l erhalten (etwa 100-fache Konzentrierung).

Die Retentatlösung wird getrennt weiter gereinigt.

Die Retentatlösung wird in der vorstehend erläuterten Weise gereinigt, wobei der präparativen Molekularsiebfiltration eine Anionenaustauscherchromatographie in der Reihenfolge voran gestellt wird. Außerdem wird in der präparativen Molekularsiebfiltration und in der analytischen Kreislaufmolekularsiebfiltration anstelle von Ultrogel AcA eine mit Epichlorhydrin vernetzte Dextranmolekularsiebmatrix (Sephadex G-50) mit einer Teilchengröße von 40 bis 120 bzw. 20 bis 80  $\mu\text{m}$  verwendet.

Bei der präparativen Molekularsiebfiltration werden die Separationsgrenzen auf 7 000 bis 3 000 Daltons eingestellt. Bei der Chromatographie an Hydroxylapatit werden RNP bei einer mittleren Phosphatkonzentration von 0,001 mol/l - 1,0 mol/ eluiert. Bei der Zonenpräzipitationschromatographie wird RNP in der Frontverteilung eluiert. In der analytischen Kreislaufmolekularsiebfiltration wird das Eluat bei einer Separationsgrenze von 7 000 im Kreislauf geführt.

Es werden etwa 8 mg RNP mit einer Reinheit > 95 % erhalten.

#### B e i s p i e l 2

3,5 kg (etwa  $7 \times 10^{12}$ ) Monozyten, die aus Schweineblut gewonnen wurden, werden unter den in Beispiel 1 angegebenen Bedingungen kultiviert. Durch den Gehalt des Kulturmediums an einem polyvalenten Lektin (CON) werden die Zellen während der Kultur stimuliert.

Die in der Kulturlösung entstandenen RNP werden nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren isoliert und in hochreinem Zustand gewonnen. Es werden ähnliche Ausbeuten wie in Beispiel 1 erreicht.

#### B e i s p i e l 3

Es wird die Herstellung von bioaktiven RNP aus einem Entzündungsgewebe und die Abtrennung der darin enthaltenen RNP von den übrigen Bestandteilen des Gewebes beschrieben. Es werden 500 g infarktiertes, ent-



zündetes Herzmuskelgewebe vom Hund verwendet. Das Herzmuskelgewebe wird bei 0 - 4 °C im Fleischwolf zerkleinert und mit dem dreifachen Volumen seines Gewichtes einer 0,05 mol/l Natriumkaliumphosphat-Pufferlösung versetzt, welche 0,001 mol/l Cystein enthält, pH 6,80. Die erhaltene Suspension wird mit einem Homogenisator (Ultraturax) homogenisiert. Anschließend wird der Überstand, der die löslichen Anteile des Entzündungsgewebes enthält, von den ungelösten Bestandteilen durch Zentrifugieren bei 10 000 x g abgetrennt. Die Arbeiten werden bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Dann wird die erhaltene Lösung 3 Stunden bei 100 000 x g zentrifugiert. Die dabei erhaltene klare Lösung wird von der oben aufschwimmenden Lipidschicht abgetrennt.

Die erhaltene RNP enthaltende klare Lösung wird nun gemäß Beispiel 1 einer fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat unterzogen. Die erhaltene konzentrierte Retentatlösung wird gemäß Beispiel 1 auf die RNP aufgearbeitet. Es werden etwa 0,03 mg RNP Morphogen erhalten.

#### B e i s p i e l 4

Gemäß Beispiel 3 wird ein Homogenisat von 500 g Leukozyten hergestellt und in der dort angegebenen Pufferlösung suspendiert. Die Aufarbeitung auf die in den Leukozyten enthaltenen bioaktiven RNP erfolgt gemäß Beispiel 1. In den nicht unter Stimulierung kultivierten Leukozyten sind nur verhältnismäßig geringe (etwa 1 %) Mengen von Monozyto-RNP enthalten. Die Ausbeuten betragen etwa 1 µg RNP.

### Patentansprüche

1. Bioaktives, metallhaltiges Ribonukleotidpoly-peptid

dadurch gekennzeichnet, daß

es folgende Teilsequenz der Nukleotide im RNA-Teil:

AAAGAGAAAGCUGCUC CGAAGNCAG

und folgende Sequenz von Aminosäuren oder Teilsequenz oder Derivat davon im Peptidteil

NH<sub>2</sub>-TKLEDHLEGIINIFHQYSVRLG  
HYDTLIKRELKQLITKELPNTLKN  
TKDQGTIDKIFQNLDANQDEQVSF  
KEFVVLVTDVLITAH DNIHKE-COOH

enthält.

2. Ribonukleotidpolypeptid gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Metallion im RNP-Komplex enthält.
3. Ribonukleotidpolypeptid gemäß Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine modifizierte Base im RNA-Teil enthält, von denen eine durch Isoguanosin repräsentiert wird.

4. Ribonukleotidpolypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Molekularmasse des nativen RNP etwa 40.000 Dalton beträgt.
5. Verfahren zur Herstellung der bioaktiven RNP nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man Zellen, Gewebe, biologische Flüssigkeiten, Exsudate, Blut, Leukozyten, Entzündungsgewebe, Hybridome, genbiologische Rekombinanten, Leukozyten oder Entzündungsgewebe und Teile davon einzeln oder gemeinsam homogenisiert, lysiert oder diese kultiviert und die entstandenen bioaktiven RNP aus den Homogenaten, Lysaten oder der überstehenden Kulturlösung gewinnt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man eine gemischte Populationen von Zellen oder Gewebeteilen des Reticulo-Endothelialen Systems oder der Abwehrzellen kultiviert.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Leukozyten in einem vollsynthetischen, serumfreien Zellkulturmedium kultiviert.
8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß man während der Kultur die Leukozyten durch Mitogene stimuliert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Anregung der Leukozyten ein polyvalentes Mitogen oder Endotoxin-Mitogen zusetzt oder eine Immunreaktion an der Zelloberfläche auslöst.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Leukozyten durch Zusatz eines Lektins anregt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Lektin aus *Canavalia ensiformis* (Concanavalin A, (CON)) verwendet.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Kultur der Leukozyten in einem Zellkulturmedium mit der in Tabelle 1 angegebenen Zusammensetzung durchführt, das Serumalbumin als einziges Protein enthält.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Kultur der Leukozyten etwa 40 Stunden bei etwa 37 °C und einer Konzentration bis zu etwa  $10^7$  bis  $10^8$  Zellen/ml Kulturlösung unter einem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck von etwa 1 % und unter ausreichender Sauerstoffzufuhr für die Kultur durchführt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man aus Homogenaten, Lysaten oder Zellkulturlösungen nach der Beendigung der Kultur durch Abtrennen der Zellen und/oder Gewebeteile, die in den Lösungen enthalte-

nen Substanzen durch Dialyse, Ultrafiltration, Aussalzen aus der Lösung, und den in der gesättigten Salzlösung löslichen Substanzanteil durch Konzentrieren dieser Lösung gewinnt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man Ammoniumsulfat zum Aussalzen verwendet.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man die Ammoniumsulfatkonzentration der Lösung stufenweise erhöht, nach jedem Ammoniumsulfatzusatz die ausgefallenen Substanzen abtrennt und damit mehrere Rohfraktionen mit abgestufter Löslichkeit bei verschiedener Ammoniumsulfatkonzentration gewinnt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die Ammoniumsulfatkonzentration der Lösung stufenweise auf 35%, 45% und 90% Sättigung einstellt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lösung des Homogenats oder Lysats oder den Überstand der Aussalzfällung nach dem Abtrennen des Substanzniederschlags durch Ultrafiltration oder Dialyse konzentriert.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die durch stufenweise Aussalzung gewonnenen Rohfraktionen und den konzentrierten Überstand der Aussalzfällung getrennt auf bioaktive RNP aufarbeitet.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß man die Aufarbeitung der Rohfraktionen und die Gewinnung der bioaktiven RNP durch präparative und analytische Molekularsiebfiltration, Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie bzw. -eintopfadsorptionsverfahren, Chromatographie an Hydroxylapatit, Zonenpräzipitationschromatographie und/oder Kreislauf- oder Kaskadenmolekularsiebfiltration in normaler oder HPLC Ausführung durchführt.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens zwei der genannten Reinigungsschritte nacheinander durchführt.
22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens drei der genannten Reinigungsschritte hintereinander durchführt.
23. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Gewinnung eines monocytären RNP eine gemischte Leukozytenpopulation oder nur Monozyten kultiviert, während der Kultur die Zellen durch CON stimuliert, die Kulturlösung nach Beendigung der Kultur mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 90 % versetzt, die ausgefallenen Proteine von dem ammoniumsulfathaltigen Überstand abtrennt, den Überstand konzentriert, durch präparative Molekularsiebfiltration, einen Anionenaustauscherchromatographie-Schritt, einen Kationenaustauscherchromatographie-Schritt, eine Chromatographie an Hydroxylapatit, eine Zonenpräzipita-

tionschromatographie und eine Kaskadenmolekularsiebfiltration reinigt und nach Abtrennung der begleitenden Fremdsubstanzen im Eluat der Kaskadenmolekularsiebfiltration in hochgereinigter Form gewinnt.

24. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Gewinnung eines leukozytären RNP eine gemischte Leukozytenpopulation oder nur Granulozyten kultiviert, gegebenenfalls während der Kultur die Zellen durch CON stimuliert, die Kulturlösung nach Beendigung der Kultur mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 35 % versetzt, die ausgefallenen Proteine von dem ammoniumsulfathaltigen Überstand abtrennt, wieder auflöst und durch einen Anionenaustauscherchromatographieschritt, eine präparative Molekularsiebfiltration, eine Kationenaustauscherchromatographie-Schritt, eine Chromatographie an Hydroxylapatit, eine Zonenpräzipitationschromatographie und eine Kaskadenmolekularsiebfiltration reinigt und nach Abtrennung der begleitenden Fremdproteine das leukozytäre RNP im Eluat der Kaskadenmolekularsiebfiltration in hochgereinigter Form gewinnt.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 und 14 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man statt der Kulturlösung der Leukozyten den löslichen Anteil eines Leukozyten- bzw. Entzündungsgewebe-Homogenats aus natürlicher oder rekombinanter Zellform verwendet.

26. Verfahren zur Herstellung der bioaktiven RNP nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die chemisch und/oder molekularbiologisch synthetisierten Sequenzen oder Teile und homologen Sequenzen davon zur Herstellung verwendet.
27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß man die chemisch und/oder biologisch synthetisierten Oligonucleotid- oder Antisensenucleotidsequenzen in vivo und in vitro, welche die nach Anspruch 1 gegebenen Teilsequenzen codieren, mit mindestens 6 Basen (oder Teilen und homologen Sequenzen davon) dieser Strukturen durch in vitro- oder vivo-Methoden, insbesondere durch die Polymerasekettenreaktion ("PCR, Polymerase Chain Reaction") und/oder die Antisense-Bioprobeßtechnik zur Herstellung einzeln oder zusammen verwendet.
28. Arzneimittel zur spezifischen Beeinflussung der Blutgefäßbildung (Angiomorphogenese) und des vaskulären Zustandes eines Gewebes des Körpers von Säugern, gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einem RNP nach Anspruch 1 bis 4 und/oder molekularbiologischen Äquivalenzstrukturen und/oder Teilen und/oder Derivaten davon und übliche Träger-, Hilfs- und Zusatzstoffe.
29. Arzneimittel zur spezifischen Beeinflussung und/oder Diagnostik bzw. Analytik der Angiomorphogenese und des vaskulären Zustandes eines Gewebes des Körpers von Säugern, gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einem anti-RNP-Immunoglobulin und/oder molekularbiologischer



Äquivalenzstrukturen und/oder Teilen und/oder Derivaten davon.

30. Verwendung mindestens eines RNP nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und/oder molekularbiologischer Äquivalenzstrukturen und/oder Teilen und/oder Derivaten davon zur spezifischen Beeinflussung und/oder Diagnostik bzw. Analytik der Angiogenese und des vaskulären Zustandes eines Gewebes des Körpers von Säugern.
31. Verwendung von mindestens einem Anti-RNP-Immunoglobulin und/oder molekularbiologischer Äquivalenzstrukturen und/oder Teilen und/oder Derivaten davon zur spezifischen Beeinflussung und/oder Diagnostik bzw. Analytik der Angiogenese und des vaskulären Zustandes eines Gewebes des Körpers von Säugern.
32. Arznei- und Hilfsmittel zur Übertragung ("shuttle") genetischer Information in Zellen, gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einem RNP nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und/oder Teilen und/oder Derivaten davon.
33. Arznei- und Hilfsmittel zur selektiven Veränderung des Nukleinsäuregehaltes von Zellen, gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einem RNP nach einem Ansprüche 1 bis 4 und/oder Teilen und/oder Derivaten davon.



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 14/47, C12P 19/34, 21/02, A61K 38/17</b>		<b>A3</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/04007</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Februar 1997 (06.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01337		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juli 1996 (17.07.96)			
(30) Prioritätsdaten: 195 25 992.0 17. Juli 1995 (17.07.95) DE 195 30 500.0 18. August 1995 (18.08.95) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WISSLER, Josef [DE/DE]; Gartenfeldstrasse 28, D-61231 Bad Nauheim (DE). LO- GEMANN, Enno [DE/DE]; Speckbacher Weg 3, D-79111 Freiburg (DE). KIESEWETTER, Stefan [DE/DE]; An der Pfaffengasse 10, D-96486 Lautertal (DE). HEILMEYER, Ludwig [DE/DE]; Girondelle 93, D-44799 Bochum (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 13. März 1997 (13.03.97)	
(74) Anwalt: BUTENSCHÖN - BERGMANN - NÖTH - REITZLE - GRAMBOW - KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).			
(54) Title: METAL-CONTAINING RIBONUCLEOTIDE POLYPEPTIDES			
(54) Bezeichnung: METALLHALTIGE RIBONUKLEOTIDPOLYPEPTIDE			
(57) Abstract			
<p>Bioactive copper-, zinc- or calcium-containing ribonucleopolypeptides (RNP) are disclosed. They are non-mitogenic morphogenetic agents for blood vessels and have a defined primary structure for intercellular communication containing genetic information. Zn/Ca/Cu-RNP may enzymatically hydrolyse nucleic acids in a controlled manner (controlled nuclease activity) and their bioactivity may be mutually modulated and controlled by means of their Zn/Ca/Cu metal ion content, that acts as a "molecular switch". These compounds selectively stimulate directional growth or morphogenesis of blood vessels <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> and cause neovascularisation of tissues. Also disclosed are a process for preparing and extracting RNP, their use and medicaments.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft bioaktive kupfer-, zink- oder calciumhaltige Ribonukleopolypeptide (RNP). Diese sind nichtmitogene Morphogene für Blutgefäße von definierter Primärstruktur zur interzellulären Kommunikation mit genetischer Information. Zn/Ca/Cu-RNP können enzymatisch Nukleinsäuren reguliert hydrolysieren (regulierte Nukleaseaktivität) und über Zn/Ca/Cu-Metallionengehalte als "molekulare Schalter" in ihrer gegenseitigen Bioaktivität moduliert und reguliert werden. Die Verbindungen regen selektiv das Richtungswachstum bzw. die Morphogenese von Blutgefäßen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> an und führen zu einer Neovaskularisierung von Geweben. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung und Gewinnung der RNP sowie ihre Verwendung und Arzneimittel.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC/DE 96/01337

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/47 C12P21/02 C12P19/34 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 46, 18 November 1994, BALTIMORE, MD US, pages 28929-28936, XP002022898 E.C. DELL'ANGELICA ET AL.: "Primary Structure and Binding Properties of Calgranulin C, a Novel S100-like Calcium-binding Protein from Pig Granulocytes" see page 28933, left-hand column, paragraph 2 - page 28935, right-hand column, paragraph 1; figures 4,8 --- -/--	1,2,5,28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 January 1997

Date of mailing of the international search report

31.01.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCI/DE 96/01337

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHEM. ENG., [INT. CONGR.] (1987), MEETING DATE 1986, 385-91. EDITOR(S): CHMIEL, HORST;HAMMES, WALTER P.; BAILEY, JAMES EDWIN. PUBLISHER: FISCHER, STUTTGART, FED. REP. GER. CODEN: 56JEAS, 1987, XP000614120 WISSLER, J. H. ET AL: "An endogenous bioactive metallo-ribonucleo-polypeptide: a copper-containing monocytic blood vessel morphogen as novel type of wound-hormone" see page 389, paragraph 2 - page 390, paragraph 1; figures 1,2; table 1 ---	1-5,7, 14-24,28
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 3, 19 January 1987 Columbus, Ohio, US; abstract no. 16813, WISSLER, J. H. ET AL: "Structure and function of a monocytic blood vessel morphogen (angiotropin) for angiogenesis in vivo and in vitro: a copper-containing metallopolyribonucleo-polypeptide as a novel and unique type of monokine" XP002022899 see abstract & PROTIDES BIOL. FLUIDS (1986), 34, 525-36 CODEN: PBFPA6;ISSN: 0079-7065, 1986, ---	1,28
A	INDIAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH, vol. 90, August 1989, pages 241-247, XP000615868 R.G. DESHPANDE AND Y.I. SHETNA: "Isolation & characterization of tumour angiogenesis factor from solid tumours & body fluids from cancer patients" see the whole document -----	1-5,28

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 C07K14/47 C12P21/02 C12P19/34 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

# B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12P A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

# C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 46, 18. November 1994, BALTIMORE, MD US, Seiten 28929-28936, XP002022898 E.C. DELL'ANGELICA ET AL.: "Primary Structure and Binding Properties of Calgranulin C, a Novel S100-like Calcium-binding Protein from Pig Granulocytes" siehe Seite 28933, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 28935, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildungen 4,8 --- -/-	1,2,5,28



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Januar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31.01.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>BIOCHEM. ENG., [INT. CONGR.] (1987), MEETING DATE 1986, 385-91. EDITOR(S): CHMIEL, HORST;HAMMES, WALTER P.; BAILEY, JAMES EDWIN. PUBLISHER: FISCHER, STUTTGART, FED. REP. GER. CODEN: 56JEAS, 1987, XP000614120</p> <p>WISSLER, J. H. ET AL: "An endogenous bioactive metallo-ribonucleo-polypeptide: a copper-containing monocytic blood vessel morphogen as novel type of wound-hormone" siehe Seite 389, Absatz 2 - Seite 390, Absatz 1; Abbildungen 1,2; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1-5,7, 14-24,28
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 3, 19. Januar 1987 Columbus, Ohio, US; abstract no. 16813, WISSLER, J. H. ET AL: "Structure and function of a monocytic blood vessel morphogen (angiotropin) for angiogenesis in vivo and in vitro: a copper-containing metallopolyribonucleo-polypeptide as a novel and unique type of monokine" XP002022899 siehe Zusammenfassung &amp; PROTIDES BIOL. FLUIDS (1986), 34, 525-36 CODEN: PBFPA6;ISSN: 0079-7065, 1986,</p> <p>---</p>	1,28
A	<p>INDIAN JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH, Bd. 90, August 1989, Seiten 241-247, XP000615868 R.G. DESHPANDE AND Y.I. SHETNA: "Isolation &amp; characterization of tumour angiogenesis factor from solid tumours &amp; body fluids from cancer patients" siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-5,28